

氨基比林-N-去甲基化酶 (AND) 活性检测试剂盒

(微量法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0472	氨基比林-N-去甲基化酶 (AND) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	粉剂 ×1 瓶: 临用前加入 100mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂二	液体 ×1 瓶: 临用前置于 37℃ 水浴中预热 30min。	4℃
试剂三	粉剂 ×1 管: 临用前加入 1mL 无水乙醇充分溶解。	4℃, 避光
试剂四	粉剂 ×1 管: 临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂五	粉剂 ×1 瓶: 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解。	室温
试剂六	液体 ×1 瓶	室温
试剂七	液体 ×1 瓶	4℃
标准液	液体 ×1 瓶: 临用前取 1.5mL EP 管, 加入 10μL 标准液, 加 990μL 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 4℃ 保存。	-20℃

一、产品说明

细胞色素 P450 酶是一组在外源物质代谢中, 尤其是药物和毒物, 具有重要作用的酶系。AND 作为 P450 酶系的重要一员, 相当于 CYP3A4 亚型, 与药物的去甲基化反应密切相关。

AND 催化氨基比林释放甲醛, 通过 Nash 比色法测定甲醛含量, 即可计算出 AND 活性。

二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、普通离心机、超速离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、无水乙醇、冰和蒸馏水。

三、粗酶液的提取

- 1、除去细胞核, 线粒体等大分子物质: 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃ 离心 30min, 取上清液转入超速离心管。
- 2、粗制微粒体: 4℃, 100 000g, 离心 60min, 弃上清液。
- 3、除血红蛋白等杂质: 向步骤 2 的沉淀中加 1mL 试剂一, 盖紧后充分震荡溶解, 100 000g 离心 30min, 弃上清液。
- 4、最终微粒体: 向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即粗酶液, 待测。该待测液需当天使用。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。

2、对照管: 取 1 支 EP 管, 加入 10 μ L 粗酶液, 170 μ L 试剂二, 10 μ L 试剂三, 10 μ L 蒸馏水, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min; 立即加入 35 μ L 试剂五, 混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入 35 μ L 试剂六, 混匀后室温静置 5min; 室温 8000rpm 离心 5min; 取新的 EP 管, 加入 100 μ L 上清液, 100 μ L 试剂七, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 对照管。

3、测定管: 取 1 支 EP 管, 加入 10 μ L 粗酶液, 170 μ L 试剂二, 10 μ L 试剂三, 10 μ L 试剂四, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min; 立即加入 35 μ L 试剂五, 混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入 35 μ L 试剂六, 混匀后室温静置 5min; 室温 8000rpm 离心 5min; 取 1 支新 EP 管, 加入 100 μ L 上清液, 100 μ L 试剂七, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 测定管。

4、标准管: 取 1 支 EP 管, 加入 100 μ L 标准品, 100 μ L 试剂七, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注: 每个样品都需要对照管。

五、活性的计算

A. 使用 96 孔酶标板计算公式如下

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

AND 活性(nmol/min/mg prot)= C 标准品 $\times$ V 标准品 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\times$ 稀释倍数 $\div$ (Cpr $\times$ V 样) $\div$ T = 45 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\div$ Cpr。

2、按照样本鲜重计算:

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 中每分钟每克组织催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

AND 活性(nmol/min/mg prot)= C 标准品 $\times$ V 标准品 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\times$ 稀释倍数 $\div$ (V 样 $\div$ V 样总 $\times$ W) $\div$ T = 45 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\div$ W。

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L; V 标准品: 500 μ L=0.0005 L; 稀释倍数: V 反总 $\div$ V 上清液 = (50+850+50+50+175+175) $\div$ 500=2.7; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; V 样: 加入粗酶液体积, 50 μ L=0.05mL; V 样总: 提取液体积, 0.5mL; T: 催化反应时间 (min), 30min。

B. 使用石英比色皿计算公式如下

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

AND 活性(nmol/min/mg prot)= C 标准品 $\times$ V 标准品 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\times$ 稀释倍数 $\div$ (Cpr $\times$ V 样) $\div$ T = 45 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\div$ Cpr。

3、按照样本鲜重计算:

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 中每分钟每克组织催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

AND 活性(nmol/min/mg prot)= C 标准品 $\times$ V 标准品 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\times$ 稀释倍数 $\div$ (V 样 $\div$ V 样总 $\times$ W) $\div$ T = 45 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ A 标准管 $\div$ W。

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L; V 标准品: 500 μ L=0.0005 L; 稀释倍数: V 反总 $\div$ V 上清液 = (50+850+50+50+175+175) $\div$ 500=2.7; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另

外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; V 样: 加入粗酶液体积, $50\mu\text{L}=0.05\text{mL}$;
V 样总: 提取液体积, 0.5mL ; T: 催化反应时间 (min) , 30min。

六、注意事项

- 1、粗酶液需在当日完成测定, 如需保存, 则向粗酶液提取步骤 3 的沉淀中加 0.5mL 20% 的甘油, 分装后, -80°C 保存。
- 2、试剂三和试剂四需临用前配制, 如当天没有用完, 4°C 避光保存, 可用 1 周。
- 3、粗酶液可直接用于蛋白浓度测定, 建议用 BCA 法测蛋白含量。